

BAFF 对免疫性血小板减少症模型小鼠的氧化应激和炎症反应的调控机制*

李巍¹ 马西虎¹ 刘晓¹ 费飞¹ 秦兰¹ 买尔吾甫·木合布力² 白玉盛¹

(1. 新疆医科大学第四附属中医医院血液科, 新疆 乌鲁木齐 830001; 2. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830054)

【摘要】 目的 探讨 B 细胞激活因子(BAFF)对免疫性血小板减少症模型小鼠的氧化应激和炎症反应的影响和潜在机制。方法 制备豚鼠抗小鼠血小板抗血清(GP-APS),并将 50 只无特定病原级别的成年雄性 BALB/c 小鼠(7~8 周龄)分为对照组(空白对照)、ITP 组(GP-APS 诱导)、ITP+rhBAFF 组(ITP 组联合静脉注射 50 μg/kg/50 μL 重组人 BAFF 蛋白)、ITP+rhBAFF+shDll1(100 μg/kg)组和 ITP+rhBAFF+shJagged1(25 μg/kg)组[构建了沉默 Dll1 的重组腺病毒载体(shDll1)和沉默 Jagged1 的重组腺病毒载体(shJagged1),在 ITP+rhBAFF 组的基础上静脉注射腺病毒载体,每日 1 次,注射 1 周],每组 10 只。1 周后取小鼠外周血,并分离单个核细胞和血清。对外周血中的血小板进行计数。用酶联免疫吸附法(ELISA)检测小鼠外周血清中 BAFF、Dll1、Jagged1、白细胞介素(IL)-1β、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)-α、活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)的水平。皮尔森相关性分析法分析外周血清中 BAFF 分别与 Dll1 和 Jagged1 的相关性。Western blot 检测小鼠外周血单个核细胞中 BAFF、Dll1、Jagged1 的蛋白表达。结果 与对照组相比,ITP 组小鼠的外周血血小板数目降低($P < 0.05$)。ITP 小鼠外周血血小板数与 BAFF 的水平呈显著负相关($r = -0.5687; P = 0.0338, 95\% CI: -0.8445 \sim -0.05464$);外周血血小板数与 Dll1 的水平呈显著负相关($r = -0.6361; P = 0.0145, 95\% CI: -0.8723 \sim -0.1592$);外周血血小板数与 Jagged1 的水平呈显著负相关($r = -0.6409; P = 0.0135, 95\% CI: -0.8742 \sim -0.1672$)。ITP 小鼠外周血中 BAFF 的水平与 Dll1 呈显著正相关($r = 0.5794; P = 0.0236, 95\% CI: 0.09544 \sim 0.8418$)。BAFF 的水平与 Jagged1 的水平呈显著性正相关($r = 0.5723; P = 0.0258, 95\% CI: 0.08489 \sim 0.8387$)。与对照组比较,ITP 组外周血中 BAFF、Dll1、Jagged1、IL-1β、IL-6、TNF-α、ROS、MDA 水平上调,GSH-PX、SOD 水平下调(均 $P < 0.05$)。与 ITP 组比较,ITP+rhBAFF 组外周血中 BAFF、Dll1、Jagged1、IL-1β、IL-6、TNF-α、ROS、MDA 水平上调,血小板数目减少,GSH-PX、SOD 水平下调(均 $P < 0.05$)。与 ITP+rhBAFF 组比较,ITP+rhBAFF+shDll1 组外周血中 Dll1、Jagged1、IL-1β、IL-6、TNF-α、ROS、MDA 水平下调,血小板数目增多,GSH-PX、SOD 水平上调(均 $P < 0.05$)。与 ITP+rhBAFF 组比较,ITP+rhBAFF+shJagged1 组外周血中 Jagged1、IL-1β、IL-6、TNF-α、ROS、MDA 水平下调,血小板数目增多,GSH-PX、SOD 水平上调(均 $P < 0.05$)。结论 BAFF 通过激活 Dll1/Jagged1 信号通路促进免疫性血小板减少症模型小鼠的氧化应激和炎症反应。

【关键词】 B 细胞激活因子; 免疫性血小板减少症; 小鼠; 氧化应激; 炎症反应

【中图分类号】 R558+.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2025. 02. 003

Study on the regulatory mechanism of BAFF on oxidative stress and inflammatory response in a mouse model of immune thrombocytopenia

LI Wei¹, MA Xihu¹, LIU Xiao¹, FEI Fei¹, QIN Lan¹, MAIERWUFU Muhebuli², BAI Yusheng¹

(1. Department of Hematology, The Fourth Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, China;

2. Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects and potential mechanisms of B-cell activating factor (BAFF) on

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2022D01C167)

通信作者:白玉盛,博士研究生导师,E-mail:15009917768@163.com

引用本文:李巍,马西虎,刘晓,等. BAFF 对免疫性血小板减少症模型小鼠的氧化应激和炎症反应的调控机制[J]. 西部医学,2025,37(2):168-174,179. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2025. 02. 003

oxidative stress and inflammatory response in a mouse model of immune thrombocytopenia (ITP). **Methods** Guinea pig anti-mouse platelet antiserum (GP-APS) was prepared, and 50 specific pathogen-free adult male BALB/c mice (7-8 weeks old) were randomly divided into 5 groups with $n=10$ in each group. The groups included a control group (blank control), an ITP group (induced by GP-APS), an ITP+rhBAFF group (ITP combined with intravenous injection of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/50 \mu\text{L}$ recombinant human BAFF protein). Recombinant adenovirus vectors silencing Dll1 (shDll1) and Jagged1 (shJagged1) were constructed, and adenovirus vectors were intravenously injected on top of the ITP+rhBAFF group once a day for 1 week, named the ITP+rhBAFF+shDll1 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) group and ITP+rhBAFF+shJagged1 (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) group, respectively. After 1 week, peripheral blood was collected from the mice and peripheral blood mononuclear cells and serum were separated. Platelet counts in peripheral blood were measured. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of BAFF, Dll1, Jagged1, interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-PX), and superoxide dismutase (SOD) in mouse serum. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between BAFF and Dll1, Jagged1 levels in peripheral blood serum. Western blot was performed to detect the protein expression of BAFF, Dll1, and Jagged1 in peripheral blood mononuclear cells. **Results** Compared to the control group, the peripheral blood platelet count in the ITP group of mice was significantly reduced ($P<0.05$). There was a significant negative correlation between the peripheral blood platelet count in ITP mice and the level of BAFF ($r=-0.5687$; $P=0.0338$, 95% CI: -0.8445 to -0.05464). Similarly, a significant negative correlation was observed between the peripheral blood platelet count and the level of Dll1 ($r=-0.6361$; $P=0.0145$, 95% CI: -0.8723 to -0.1592), as well as between the peripheral blood platelet count and the level of Jagged1 ($r=-0.6409$; $P=0.0135$, 95% CI: -0.8742 to -0.1672). The level of BAFF in peripheral blood of ITP mice was positively correlated with Dll1 ($r=0.5794$; $P=0.0236$, 95% CI: 0.09544 - 0.8418). The level of BAFF was significantly positively correlated with Jagged1 ($r=0.5723$; $P=0.0258$, 95% CI: 0.08489 - 0.8387). Compared with the control group, the levels of BAFF, Dll1, Jagged1, IL-1 β , IL-6, TNF- α , ROS, MDA were upregulated, and the levels of GSH-PX and SOD were downregulated in the peripheral blood of the ITP group ($P<0.05$). Compared with the ITP group, the levels of BAFF, Dll1, Jagged1, IL-1 β , IL-6, TNF- α , ROS, MDA were upregulated, platelet count was decreased, and the levels of GSH-PX and SOD were downregulated in the peripheral blood of the ITP+rhBAFF group ($P<0.05$). Compared with the ITP+rhBAFF group, the levels of Dll1, Jagged1, IL-1 β , IL-6, TNF- α , ROS, MDA were downregulated, platelet count was increased, and the levels of GSH-PX and SOD were upregulated in the peripheral blood of the ITP+rhBAFF+shDll1 group ($P<0.05$). Compared with the ITP+rhBAFF group, the levels of Jagged1, IL-1 β , IL-6, TNF- α , ROS, MDA were downregulated, platelet count was increased, and the levels of GSH-PX and SOD were upregulated in the peripheral blood of the ITP+rhBAFF+shJagged1 group ($P<0.05$). **Conclusion** BAFF promotes oxidative stress and inflammatory response in a mouse model of immune thrombocytopenia by activating the Dll1/Jagged1 signaling pathway.

【Key words】 B-cell activator; Immune thrombocytopenia; Mice; Oxidative stress; Inflammatory response

原发性免疫性血小板减少症(Immune thrombocytopenia, ITP)是一种以血小板减少和自身免疫机制异常为特征的疾病^[1],其治疗方法包括糖皮质激素和静脉输注人免疫球蛋白等,但存在治疗后病情反复迁延、药物副作用大等问题^[2],因此探讨 ITP 的分子机制以寻找新的特异性良好的治疗靶点具有重要意义。最近,炎症和氧化应激(Oxidative stress, OS)被都确定参与 ITP 的关键发病特征^[3-4],然而炎症和氧化应激在 ITP 中受何种机制调控尚不清楚。B 细胞激活因子(B-cell activating factor, BAFF)在 ITP 发病过程中发挥重要作用^[5-6],多项报道^[7-8]证实 BAFF 可以调控细胞的炎症反应和氧化应激损伤,但关于 BAFF 对 ITP 炎症反应和氧化应激的作用尚不清楚。Dll1 和 Jagged1 是 Notch 受体的配体蛋白,在免疫系统中具

有关键的调节作用^[9]。研究^[10-12]发现, Dll1/Jagged1 信号通路可能在 ITP 的发病中起到重要的作用。然而, Dll1/Jagged1 信号通路在 ITP 发病机制中的具体关联和作用机制仍不明确。因此,本研究探讨 BAFF 通过 Dll1/Jagged1 信号通路对 ITP 小鼠模型中氧化应激和炎症反应的调控作用,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与耗材 56 只无特定病原级别的成年雄性 BALB/c 小鼠(7~8 周龄)和 6 只无特定病原级别的成年雄性豚鼠购于上海斯莱克实验动物中心,其中 6 只 BALB/c 小鼠和 6 只豚鼠用于豚鼠抗小鼠血小板抗血清(Guinea pig antimouse platelet serum, GP-APS)的制备,剩余 50 只 BALB/c 小鼠用于分组干预的实验研究。人重组 BAFF 蛋白(rhBAFF)购于上海中乔新

舟生物科技有限公司。沉默 Dll1 的重组腺病毒载体 (shDll1) 和沉默 Jagged1 的重组腺病毒载体 (shJagged1) 均构建于上海吉玛公司。EDTA-Na₂ 抗凝剂管购于美国 BD 公司。BAFF、Dll1、Jagged1、IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF)- α 、活性氧 (Reactive oxygen species, ROS)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-PX)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 的酶联免疫吸附测试 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒和电化学发光 (Electrochemical luminescence, ECL) 试剂均购于上海碧云天生物科技有限公司。BAFF、Dll1、Jagged1、磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的一抗和辣根过氧化物酶 (Horse radish peroxidase, HRP) 偶联的山羊抗兔免疫球蛋白 IgG 二抗购于英国 Abcam 公司。RIPA 蛋白提取试剂盒和二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白检测试剂盒购于北京生工公司。PVDF 膜购于美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 GP-APS 的制备 BALB/c 小鼠经乙醚麻醉后, 眼球摘除取血 (EDTA-Na₂ 抗凝), 分离血小板并洗涤, 用生理盐水稀释。取已准备好的血小板分别与等量弗氏佐剂和不弗氏佐剂混合成油包水状作为抗原。取含有弗氏佐剂的抗原于 0 周注射于豚鼠足掌、背及腹部皮下, 第 5 周豚鼠心脏取血 (不抗凝)。560 r/min, 离心 10 min, 取上清, 得到 GP-APS, -20 °C 保存。本实验中所有的动物实验均经新疆医科大学第四附属中医医院动物实验伦理委员会的审批通过 (伦理批号: 202204094)。①取 BALB/C 小鼠, 利用乙醚麻醉后摘除眼球法取血, EDTA-Na₂ 抗凝, 离心分离血小板并洗涤, 用 0.9% 氯化钠溶液稀释调整血小板浓度。②取制备好的血小板分别与等量完全弗氏佐剂 (FCA) 和不完全弗氏佐剂 (FICA) 混合成油包水状做成抗原, 取含完全弗氏佐剂抗原于 0 周皮下注射于豚鼠后足掌、背部、腹部及腹股沟等至少 4 个位置, 取含不完全弗氏佐剂抗原分别于第 1、2、4 周皮下注射于豚鼠后足掌、背及腹部, 每次 4 点, 在第 5 周从豚鼠心脏取不抗凝全血, 1 500 r/min 离心 10 min, 取上层血清即为 GP-APS, 贮存于 -20 °C 冰箱待用。

1.2.2 抗小鼠血小板抗血清效价检测 采用琼脂双向扩散法, 应用 0.9% 氯化钠溶液配制 1% 琼脂, 制作琼脂平板待其凝固后, 用打孔器打成梅花形孔环, 中间孔加血小板悬液, 周边孔滴加倍比稀释的不同浓度的豚鼠抗小鼠血小板抗血清, 置于 37 °C 温箱孵育 24 h

后观察沉淀弧, 确定抗血清效价及实验最佳稀释度。

1.2.3 小鼠 ITP 模型的建立 BALB/C 小鼠适应性饲养后, 随机抽取其中 10 只作为对照组, 10 只小鼠作为 ITP 组。将已制备的豚鼠抗小鼠血小板抗血清 (GP-APS) 从 -20 °C 冰箱取出放置于 56 °C 水浴 30 min。将 ITP 组小鼠于 1、3、7、14 d, 分别腹腔注射 100 μ L 用 0.9% 氯化钠溶液按 1:4 比例稀释后的 GP-APS, 以维持血小板的持续降低。同时给对照组小鼠腹腔注射等容量 0.9% 氯化钠溶液。

1.2.4 分组与给药治疗方法 除对照组和 ITP 组外, 还建立 rhBAFF 蛋白注射组, 即 ITP 组联合静脉注射重组人 BAFF 蛋白 (ITP+rhBAFF 组), rhBAFF 的注射剂量为 50 μ g/kg \cdot 50 μ L。为确定 BAFF 是否通过 Dll1/Jagged1 信号通路调控炎症反应和氧化应激, 我们构建了沉默 Dll1 的重组腺病毒载体 (shDll1) 和沉默 Jagged1 的重组腺病毒载体 (shJagged1), 分别设立 ITP+rhBAFF+shDll1 组和 ITP+rhBAFF+shJagged1 组。载体均为静脉注射, shDll1 注射剂量为 100 μ g/kg; shJagged1 为 25 μ g/kg; 联合注射组静脉注射总体积均为 50 μ L。每组 10 只小鼠。连续注射 1 周, 1 周后取小鼠静脉血用于血小板计数, 随后分离外周血清和单个核细胞保存于 -20 °C 用于后续实验研究。

1.2.5 血小板计数 取小鼠外周血, 加入带有 EDTA-Na₂ 抗凝剂的试管中, 使血液充分与抗凝剂混合后, 采用全自动血液分析仪检测血小板计数。

1.2.6 ELISA 法检测小鼠外周血清中 BAFF、Dll1、Jagged1、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、ROS、MDA、GSH-PX、SOD 的水平 根据制造商的说明, 使用相应的商用 ELISA 试剂盒检测各组小鼠血清中 BAFF、Dll1、Jagged1、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、ROS、MDA、GSH-PX、SOD 的浓度。于 Bio-Rad 3350 酶标仪上记录 450 nm 处的吸光度。

1.2.7 Western blot 检测小鼠外周血单个核细胞中 BAFF、Dll1、Jagged1 的表达 单个核细胞在预冷 PBS 缓冲液中洗涤 3 次, 用 RIPA 分离总蛋白。BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。等量的总蛋白电泳到 SDS-PAGE。然后, 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。用 BAFF、Dll1、Jagged1 的一抗 (均为 1:800) 在 4 °C 下孵育过夜。然后, 用 HRP 偶联的山羊抗兔免疫球蛋白 IgG 二抗 (1:2 000) 孵育 2 h。用 ECL 化学发光试剂对膜上的条带进行显色。采用 GAPDH 作为内参蛋白归一化, 采用 ImageJ 软件对蛋白条带灰度值进行分析定量。

1.3 统计学分析 本研究数据均采用 SPSS 23.0 软

件进行统计,以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示计量资料。皮尔森相关性分析法分析 ITP 组小鼠外周血清中 BAFF 浓度与 Dll1 和 Jagged1 浓度的相关性。用单因素方差分析法统计各组之间数据差异显著性,采用 LSD-*t* 进行两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BAFF、Dll1、Jagged1 在 ITP 诱导的免疫性血小板减少症模型小鼠体内的表达的相关性分析 为验证 ITP 诱导的免疫性血小板减少症模型是否建立成功,本研究检测了外周血血小板的数目,与对照组($389.23 \pm 32.09 \times 10^9/\text{个/L}$)相比,ITP 组小鼠的外周血血小板数目($92.23 \pm 10.88 \times 10^9/\text{个/L}$)降低($P<0.05$),提示 ITP 小鼠模型建立成功。根据皮尔森相关性分析发现,外周血血小板数与 BAFF 的水平呈显著负相关($r=-0.5687$; $P=0.0338$, 95% CI: $-0.8445 \sim -0.05464$);外周血血小板数与 Dll1 的水平呈显著负相关($r=-0.6361$; $P=0.0145$, 95% CI: $-0.8723 \sim -0.1592$);外周血血小板数与 Jagged1 的水平呈显著负相关($r=-0.6409$; $P=0.0135$, 95% CI: $-0.8742 \sim -0.1672$)(见图 1)。ITP 小鼠外周血中 BAFF 的水平与 Dll1 呈显著正相关($r=0.5794$; $P=0.0236$, 95% CI: $0.09544 \sim 0.8418$)。并且 BAFF 的水平与 Jagged1 的水平也呈显著性正相关($r=0.5723$; $P=0.0258$, 95% CI: $0.08489 \sim 0.8387$),见图 2。

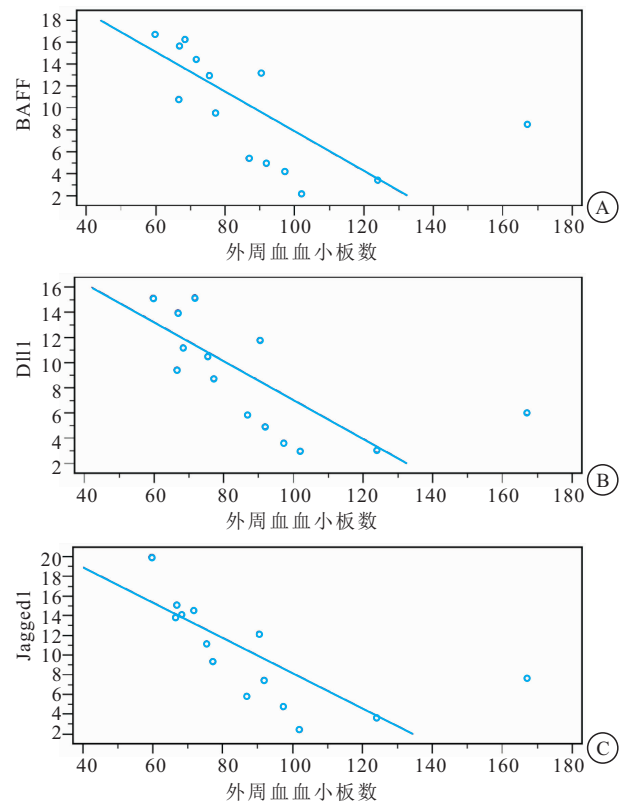


图 1 血小板减少症模型小鼠的外周血血小板数与 BAFF、Dll1、Jagged1 水平的相关性

Figure 1 Correlation between peripheral blood platelet count and levels of BAFF, Dll1, and Jagged1 in thrombocytopenic model mice

注: A. 皮尔森检验分析外周血血小板数与 BAFF 水平的相关性; B. 皮尔森检验分析外周血血小板数与 Dll1 水平的相关性; C. 皮尔森检验分析外周血血小板数与 Jagged1 水平的相关性。

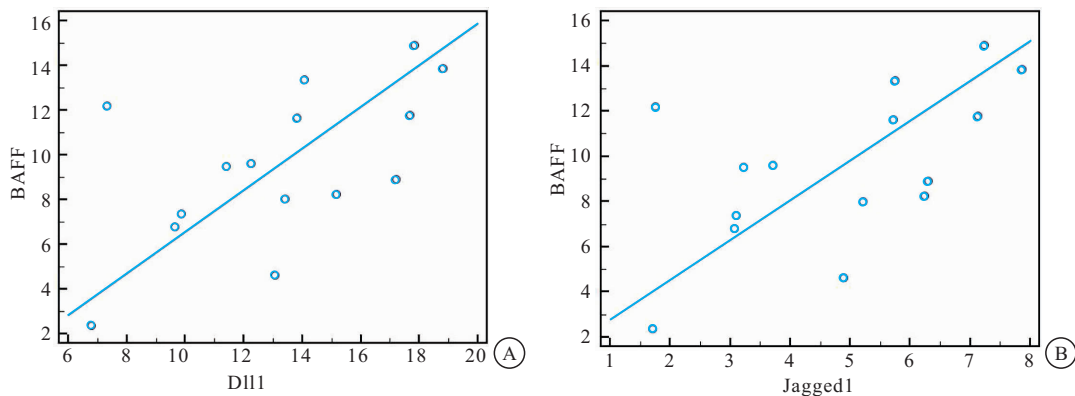


图 2 血小板减少症模型小鼠的 BAFF 水平分别与 Dll1 和 Jagged1 水平的相关性

Figure 2 Correlation between BAFF levels and levels of Dll1 and Jagged1 in thrombocytopenic model mice

注: A. 皮尔森检验分析 BAFF 和 Dll1 水平的相关性; B. 皮尔森检验分析 BAFF 和 Jagged1 水平的相关性。

2.2 BAFF 对小鼠单个核细胞中 Dll1/Jagged1 信号通路的调节作用 与对照组比较,ITP 组外周血中 BAFF 的水平上调($P<0.05$);与 ITP 组比较,ITP+rhBAFF 组外周血中 BAFF 的水平上调($P<0.05$);与 ITP+rhBAFF 组比较,ITP+rhBAFF+shDll1 组

外周血中 BAFF 的水平变化差异无统计学意义($P>0.05$);与 ITP+rhBAFF 组比较,ITP+rhBAFF+shJagged1 组外周血中 BAFF 的水平变化差异无统计学意义($P>0.05$)。另外,与对照组比较,ITP 组单个核细胞中 Dll1 和 Jagged1 的相对表达水平上调($P<$

0.05);与 ITP 组比较,ITP+rhBAFF 组 Dll1 和 Jagged1 的相对表达水平上调($P < 0.05$);与 ITP+rhBAFF 组比较,ITP+rhBAFF+shDll1 组 Dll1 和 Jagged1 的相对表达水平下调($P < 0.05$);与 ITP+rh-

BAFF 组比较,ITP+rhBAFF+shJagged1 组 Jagged1 的相对表达水平下调($P < 0.05$),而 Dll1 的相对表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。

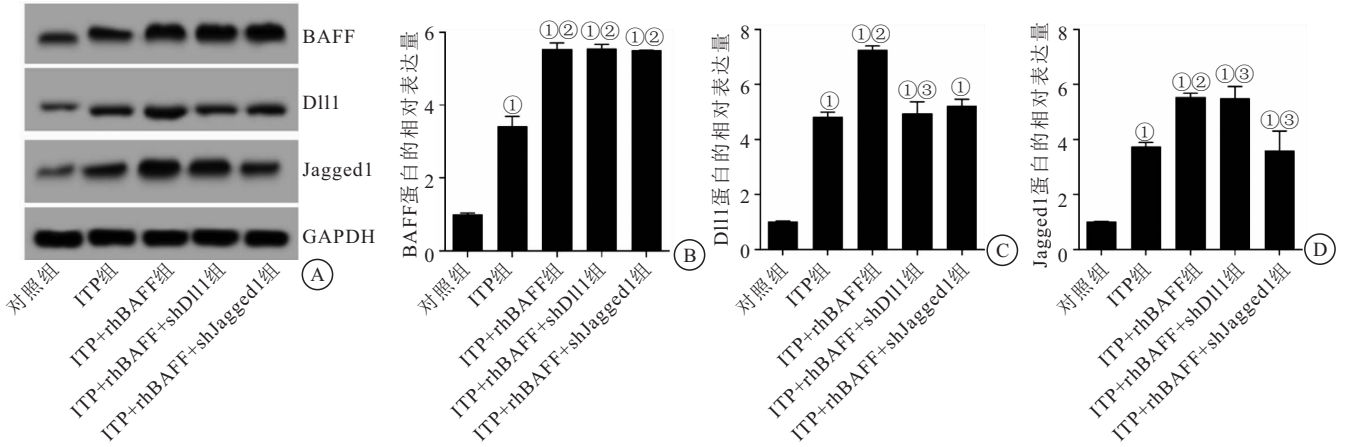


图 3 各组小鼠单个核细胞中 BAFF 和 Dll1/Jagged1 信号通路蛋白表达水平的比较

Figure 3 Comparison of BAFF and Dll1/Jagged1 signaling pathway protein expression levels in mononuclear cells of mice from different groups

注:A. BAFF、Dll1、Jagged1 的 Western blot 蛋白条带;B. 各组 BAFF 表达量的比较;C. 各组 Dll1 表达量的比较;D. 各组 Jagged1 表达量的比较。与对照组比较,① $P < 0.05$;与 ITP 组比较,② $P < 0.05$;与 ITP+rhBAFF 组比较,③ $P < 0.05$ 。

2.3 BAFF 通过 Dll1/Jagged1 信号通路调控小鼠的血小板数 与对照组比较,ITP 组的血小板数减少($P < 0.05$);与 ITP 组比较,ITP+rhBAFF 组的血小板数减少($P < 0.05$);与 ITP+rhBAFF 组比较,ITP+rhBAFF+shDll1 组的血小板数增加($P < 0.05$);与 ITP+rhBAFF 组比较,ITP+rhBAFF+shJagged1 组的血小板数增加($P < 0.05$)。见图 4。

板减少症模型小鼠的炎症反应 与对照组比较,ITP 组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平上调,IL-10、IL-4 的水平下调(均 $P < 0.05$);与 ITP 组比较,ITP+rhBAFF 组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平上调,IL-10、IL-4 的相对表达水平下调(均 $P < 0.05$);与 ITP+rhBAFF 组比较,ITP+rhBAFF+shDll1 组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平下调,IL-10、IL-4 的水平上调(均 $P < 0.05$);与 ITP+rhBAFF 组比较,ITP+rhBAFF+shJagged1 组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平下调,IL-10、IL-4 的水平上调(均 $P < 0.05$)。见图 5。

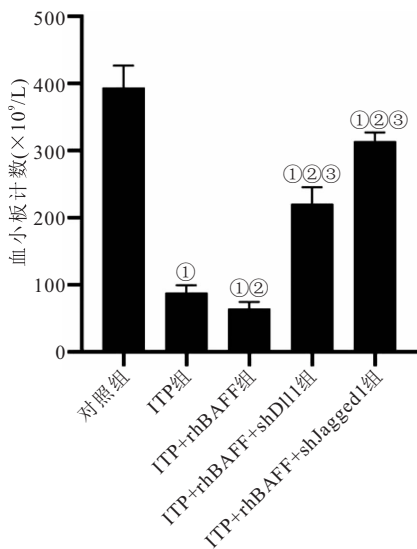


图 4 各组小鼠血小板数目的比较

Figure 4 Comparison of platelet counts among different groups of mice

注:与对照组比较,① $P < 0.05$;与 ITP 组比较,② $P < 0.05$;与 ITP+rhBAFF 组比较,③ $P < 0.05$ 。

2.4 BAFF 通过 Dll1/Jagged1 信号调节免疫性血小

2.5 BAFF 通过 Dll1/Jagged1 信号调节免疫性血小板减少症模型小鼠的氧化应激反应 与对照组比较,ITP 组的 ROS、MDA 水平上调,GSH-PX、SOD 的水平下调(均 $P < 0.05$);与 ITP 组比较,ITP+rhBAFF 组的 ROS、MDA 水平上调,GSH-PX、SOD 水平下调(均 $P < 0.05$);与 ITP+rhBAFF 组比较,ITP+rhBAFF+shDll1 组的 ROS、MDA 水平下调,GSH-PX、SOD 的水平上调(均 $P < 0.05$);与 ITP+rhBAFF 组比较,ITP+rhBAFF+shJagged1 组的 ROS、MDA 水平下调,GSH-PX、SOD 的水平上调(均 $P < 0.05$)。见图 6。

3 讨论

外周血小板计数低于 $100 \times 10^9/L$,临床上确诊为 ITP^[13]。本研究利用豚鼠抗小鼠血小板血清(GP-APS)诱导建立了 ITP 小鼠模型,并检测了小鼠体内的血小板数仅为 $89 \times 10^9/L$,这表明了 ITP 小鼠模型

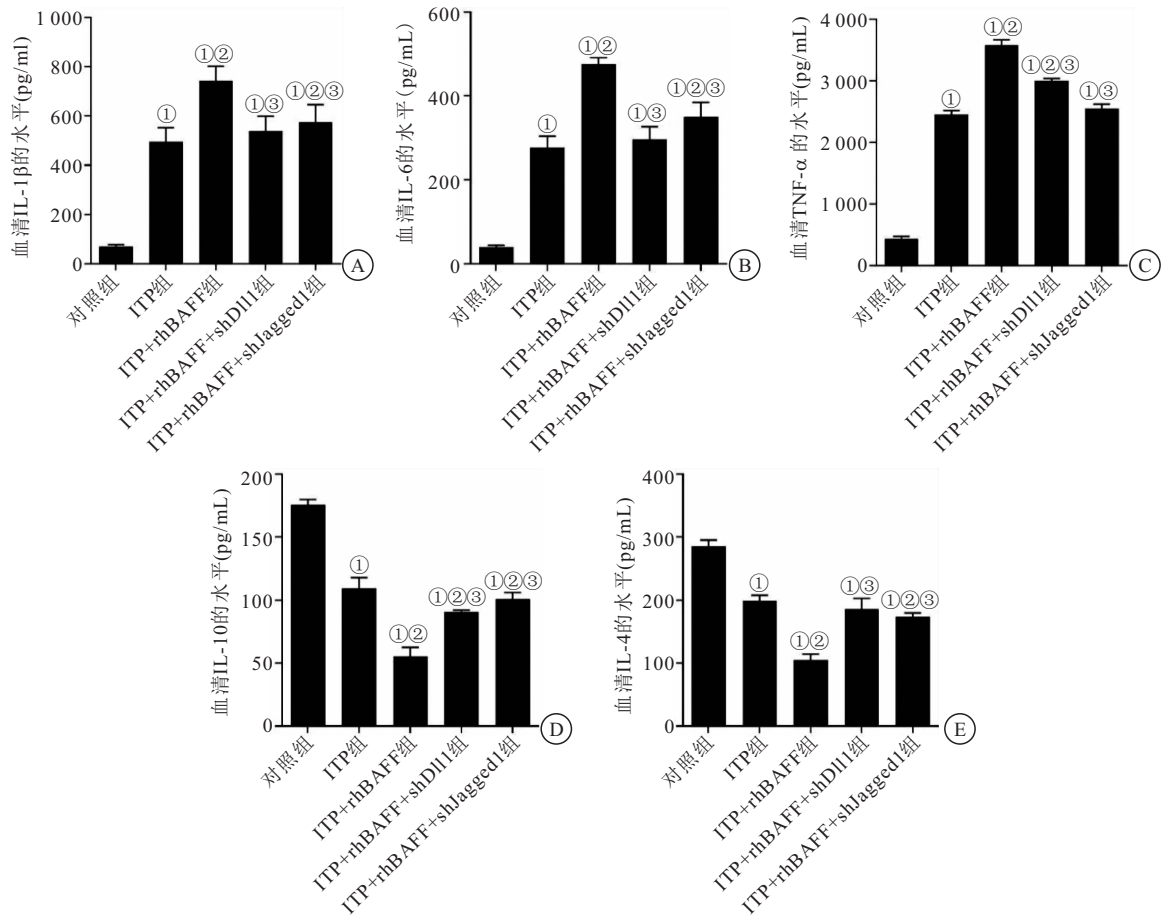


图 5 各组小鼠血清中炎症因子水平的比较

Figure 5 Comparison of inflammatory factor levels in the serum of mice from different groups

注:A. ELISA 法检测各组小鼠血清中的 IL-1β 水平;B. ELISA 法检测各组小鼠血清中的 IL-6 水平;C. ELISA 法检测各组小鼠血清中的 TNF-α 水平;D. ELISA 法检测各组小鼠血清中的 IL-10 水平;E. ELISA 法检测各组小鼠血清中的 IL-4 水平。与对照组比较,①P<0.05;与 ITP 组比较,②P<0.05;与 ITP+rhBAFF 组比较,③P<0.05。

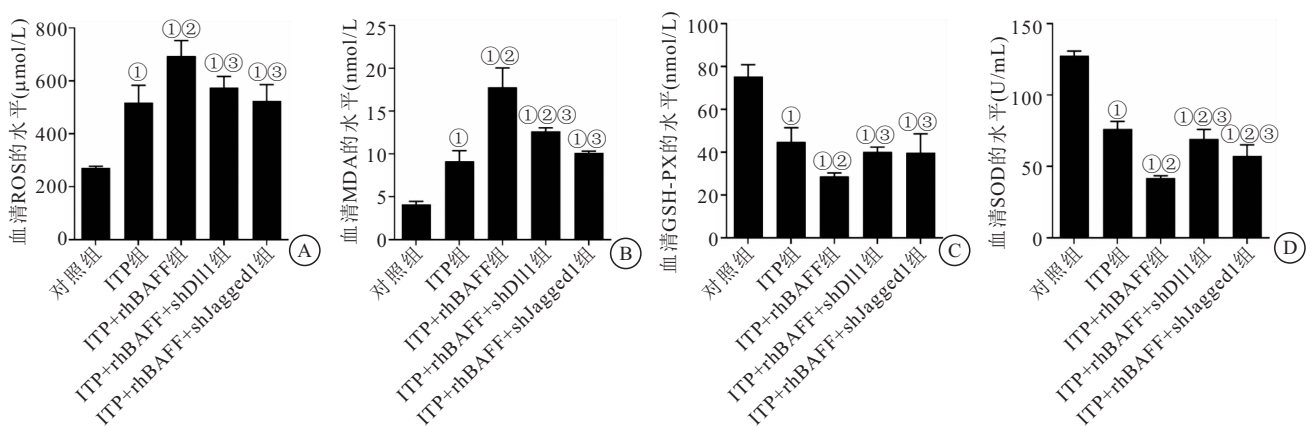


图 6 各组小鼠血清中氧化应激标志物的比较

Figure 6 Comparison of oxidative stress markers in the serum of mice from different groups

注:A. ELISA 法检测各组小鼠血清中的 ROS 水平;B. ELISA 法检测各组小鼠血清中的 MDA 水平;C. ELISA 法检测各组小鼠血清中的 GSH-PX 水平;D. ELISA 法检测各组小鼠血清中的 SOD 水平。与对照组比较,①P<0.05;与 ITP 组比较,②P<0.05;与 ITP+rhBAFF 组比较,③P<0.05。

诱导成功。另外,通过对外周血中 BAFF、Dil1 和 Jagged1 水平的监测和相关性分析,发现 BAFF 与 Dil1、Jagged1 呈显著正相关。进一步的实验结果显示,

BAFF 通过 Dil1/Jagged1 信号通路调节了小鼠血小板数和炎症反应,揭示了它们在 ITP 发病过程中的潜在机制。这些发现可能为 ITP 的发病机制提供新的

见解,进一步初步阐明了 BAFF 与 Dll1/Jagged1 信号通路之间的相互作用,并揭示了它们在 ITP 发病中的重要调控作用。

通过皮尔森相关性分析发现在 ITP 小鼠的外周血中,BAFF 的水平分别与 Dll1 和 Jagged1 水平呈显著性正相关。这一结果表明,在 ITP 发病过程中,BAFF 可能通过与 Dll1 和 Jagged1 的相互作用来调节免疫系统的异常反应。Dll1 和 Jagged1 是 Notch 信号通路的关键配体,在免疫系统中具有重要的调节作用^[14]。以往的研究^[15-16]已经证实 Dll1/Jagged1 信号通路参与了免疫细胞的分化和活化过程,与自身免疫性疾病的发展密切相关。然而,在 ITP 中,Dll1 和 Jagged1 的具体作用机制仍不清楚。本研究结果提示,BAFF 通过 Dll1/Jagged1 信号通路抑制了小鼠血小板数目和炎症反应的变化。具体而言,外周血中 BAFF 水平的上调导致 Dll1 和 Jagged1 的表达增加,进而导致血小板数目减少并引发炎症反应的加剧。这一结果证实了 BAFF 与 Dll1/Jagged1 信号通路之间的相互作用对 ITP 发病过程的重要性。提示,BAFF 可通过调节 Dll1/Jagged1 信号通路对 ITP 发病过程产生影响。

以往的研究^[17]表明,氧化应激与 ITP 的发病和进展密切相关,氧化应激是细胞内氧自由基产量增加或抗氧化能力降低导致细胞内氧化还原失衡的状态^[18]。在免疫系统中,氧化应激与多种疾病的发生和发展密切相关,包括自身免疫性疾病、肿瘤和炎症性疾病等^[19]。在 ITP 中,氧化应激在该疾病的发病和进展中起到了关键的作用^[3, 19]。ROS 的产生和清除是维持细胞氧化还原平衡的重要因素。在 ITP 患者中,过度激活的免疫系统会导致炎症反应的增加和氧化应激的增加。过量的 ROS 对血小板和血管内皮细胞的功能产生了不良影响,引起血小板减少和炎症反应的加剧^[20]。此外,抗氧化酶 GSH-PX 和 SOD 是细胞内主要的抗氧化防御分子,它们能够清除细胞内 ROS 并保持氧化还原平衡^[21]。在 ITP 中,GSH-PX 和 SOD 的下调可能导致细胞对 ROS 的清除能力降低,进一步加重氧化应激反应^[22]。本研究中发现 BAFF 通过 Dll1/Jagged1 信号通路上调了 ROS 和 MDA 水平,并抑制了 GSH-PX 和 SOD 的表达。这一结果进一步支持了氧化应激在 ITP 发病中的重要性。通过 BAFF 与 Dll1/Jagged1 的相互作用,氧化应激信号的紊乱可能参与了 ITP 的发展过程,导致血小板减少和炎症反应的加剧。

尽管目前尚未完全理解 BAFF、Dll1/Jagged1 信号通路和氧化应激之间的详细机制,但本研究的发现

为研究 ITP 发病机制和开发新的治疗策略提供了重要线索。未来研究可以进一步探究如何干预 BAFF 与 Dll1/Jagged1 信号通路以及氧化应激反应,从而调控 ITP 的发展过程和炎症反应。此外,通过减轻氧化应激反应可能有助于恢复血小板减少和改善病情。

本研究仅通过小鼠模型进行了实验研究,还需要进一步验证。此外,对于 BAFF 调节 Dll1/Jagged1 信号通路对氧化应激和炎症反应的具体分子机制,还需要进一步深入的研究。

4 结论

本研究在 ITP 小鼠模型中发现,BAFF 通过激活 Dll1/Jagged1 信号通路促进炎症反应和氧化应激。因此,抑制 BAFF 与 Dll1/Jagged1 信号通路的相互作用有望成为治疗 ITP 的新策略。

【参考文献】

- [1] BUSSEL J B, KNIGHTLY K A. Immune thrombocytopenia (ITP) in pregnancy[J]. *British journal of haematology*, 2024, 204(4):1176-1177.
- [2] BUSSEL J B, HOU M, CINES D B. Management of primary immune thrombocytopenia in pregnancy[J]. *N Engl J Med*, 2023, 389(6): 540-548.
- [3] MEDOVIC R H, SREJOVIC I M, MEDOVIC M V, *et al.* Variations of redox balance in different stages of childhood immune thrombocytopenic Purpura[J]. *Thromb Haemost*, 2023, 123(12): 1129-1139.
- [4] GUARINA A, BARONE A, TORNESELLO A, *et al.* Association of immune thrombocytopenia and inflammatory bowel disease in children[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(9): 1940.
- [5] ROESER A, LAZARUS A H, MAHÉVAS M. B cells and antibodies in refractory immune thrombocytopenia [J]. *Br J Haematol*, 2023, 203(1): 43-53.
- [6] XU P C, SHAO X, OU Y, *et al.* Neutrophils contribute to elevated BAFF levels to modulate adaptive immunity in patients with primary immune thrombocytopenia by CD62P and PSGL1 interaction[J]. *Clin Transl Immunology*, 2022, 11(7): e1399.
- [7] NERI C, CILIBERTI A, DESSI D A, *et al.* B-cell-activating factor (BAFF) and platelet-activating factor (PAF) in pregnancies complicated by maternal obesity and diabetes: a preliminary study[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2023, 36(2): 2272010.
- [8] PARK S, JANG J W, MOON E Y. BAFF attenuates oxidative stress-induced cell death by the regulation of mitochondria membrane potential via Syk activation in WiL2-NS B lymphoblasts [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 11784.
- [9] KRISHNASAMY K, LIMBOURG A, KAPANADZE T, *et al.* Blood vessel control of macrophage maturation promotes arteriogenesis in ischemia[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 952.
- [10] CAI W X, SHEN K, JI P, *et al.* The Notch pathway attenuates burn-induced acute lung injury in rats by repressing reactive oxygen species[J]. *Burns Trauma*, 2022, 10: tkac008.

- [5] 郭颖, 王晓尉, 周芳, 等. 肥胖对雄性大鼠生殖功能影响的机制研究[J]. 生殖医学杂志, 2018, 27(5):426-430.
- [6] ZHANG D K, WEI Y H, HUANG Q N, *et al.* Important hormones regulating lipid metabolism [J]. *Molecules*, 2022, 27(20):7052.
- [7] KIM D H, CHUN S Y, LEE E, *et al.* IL-10 deficiency aggravates renal inflammation, fibrosis and functional failure in high-fat dieted obese mice[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2021, 18(3):399-410.
- [8] LIU W Y, ZHU Y K, YE L, *et al.* Establishment of an orthotopic prostate cancer xenograft mouse model using microscope-guided orthotopic injection of LNCaP cells into the dorsal lobe of the mouse prostate[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1):173.
- [9] 归洪伟. 代谢综合征与前列腺增生并发组织学前列腺炎的相关性研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2022.
- [10] 黄庄楷, 何学军. 良性前列腺增生的危险因素[J]. 汕头大学医学院学报, 2022, 35(2): 120-122.
- [11] 李圆龙, 马婧, 韩瑞钰, 等. 捐精志愿者精浆生化指标与精液常规参数的相关性分析[J]. 中华男科学杂志, 2021, 27(3):213-218.
- [12] RODRIGUEZ-MARTINEZ H, MARTINEZ E A, CALVETE J J, *et al.* Seminal plasma: relevant for fertility? [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9):4368.
- [13] 段锦龙, 马卫国. 不育症患者年龄与精液质量和性激素的相关性研究[J]. 中国性科学, 2022, 31(12):13-16.
- [14] NOVEL FOODS AND FOOD ALLERGENS (NDA) EFSA PANEL ON NUTRITION, CASTENMILLER J, DE HENAUW S, *et al.* Appropriate age range for introduction of complementary feeding into an infant's diet[J]. *EFSA J*, 2019, 17(9):e05780.
- [15] QIAO L P, CHU K, WATTEZ J S, *et al.* High-fat feeding reprograms maternal energy metabolism and induces long-term postpartum obesity in mice[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2019, 43(9):1747-1758.
- [16] ZHENG J, ZHANG L, LIU J Y, *et al.* Long-term effects of maternal low-protein diet and post-weaning high-fat feeding on glucose metabolism and hypothalamic POMC promoter methylation in offspring mice[J]. *Front Nutr*, 2021, 8:657848.
- [17] 《糖尿病合并男性功能障碍多学科中国专家共识》编写专家委员会. 糖尿病合并男性功能障碍多学科中国专家共识[J]. 中国男科学杂志, 2022, 36(1):3-33.
- [18] 刘津念, 郑剑, 殷永健, 等. PM_{2.5} 暴露后激活核转录因子/环氧化酶 2/前列腺素 E₂ 信号通路引起氧化应激损伤雄性生殖功能的机制研究[J]. 实用医院临床杂志, 2021, 18(5):9-13.
- [19] 苗润泽, 羊羨, 李博, 等. 前炎止痛贴联合前列清瘀汤治疗慢性前列腺炎疗效及对前列腺液 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 表达的影响[J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(10):1944-1947.
- [20] YU L S, YANG X J, MA B, *et al.* Abnormal arachidonic acid metabolic network may reduce sperm motility via P38 MAPK [J]. *Open Biol*, 2019, 9(4):180091.
- [21] 刘永杰, 方永清, 张帆, 等. 精浆环氧化酶(COX)1、COX2 的检测及其临床应用价值[J]. 宁夏医学杂志, 2019, 41(6):540-542.

(收稿日期: 2024-04-07; 修回日期: 2024-05-10; 修回日期: 王小菊)

(上接第 174 页)

- [11] MA D X, DAI J J, ZHU X J, *et al.* Aberrant expression of Notch signaling molecules in patients with immune thrombocytopenic Purpura[J]. *Ann Hematol*, 2010, 89(2): 155-161.
- [12] LIU S Y, QU H T, SUN R J, *et al.* High-throughput DNA methylation analysis in ITP confirms NOTCH1 hypermethylation through the Th1 and Th2 cell differentiation pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 111: 109105.
- [13] DESOUZA S, ANGELINI D. Updated guidelines for immune thrombocytopenic Purpura: expanded management options[J]. *Cleve Clin J Med*, 2021, 88(12): 664-668.
- [14] YU L, ZHANG L Q, JIANG Z Y, *et al.* Decreasing lncRNA PVT1 causes Treg/Th17 imbalance via NOTCH signaling in immune thrombocytopenia[J]. *Hematology*, 2021, 26(1): 734-740.
- [15] QU J C, QU H Q, BRADFIELD J P, *et al.* Association of DLL1 with type 1 diabetes in patients characterized by low polygenic risk score[J]. *Metabolism*, 2021, 114: 154418.
- [16] HÖLLE T, REHN P, LEVENTOGIANNIS K, *et al.* Evaluation of the novel sepsis biomarker host-derived delta-like canonical Notch ligand 1-a secondary analysis of 405 patients suffering from inflammatory or infectious diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9164.
- [17] WÓJCIK P, GEGÓTEK A, ŽARKOVIČN, *et al.* Oxidative stress and lipid mediators modulate immune cell functions in autoimmune diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 723.
- [18] KAR Y D, ÖZDEMİR Z C, BÖR Ö. Thiol/disulfide balance and oxidative stress parameters in pediatric patients diagnosed with acute and chronic idiopathic thrombocytopenic Purpura[J]. *Turk J Pediatr*, 2021, 63(6): 962-969.
- [19] WANG S, LIU Y, LI G S, *et al.* Reduced intracellular antioxidant capacity in platelets contributes to primary immune thrombocytopenia via ROS-NLRP3-caspase-1 pathway [J]. *Thromb Res*, 2021, 199: 1-9.
- [20] UNNO K, OIKONOMOPOULOS A, FUJIKAWA Y, *et al.* Alteration in ventricular pressure stimulates cardiac repair and remodeling[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 133: 174-187.
- [21] BI Y J, LI X J, WEI H D, *et al.* Resveratrol improves emamectin benzoate-induced pyroptosis and inflammation of *Ctenopharyngodon idellus* hepatic cells by alleviating oxidative stress/endoplasmic reticulum stress[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2023, 142: 109148.
- [22] JIN C Q, DONG H X, CHENG P P, *et al.* Antioxidant status and oxidative stress in patients with chronic ITP [J]. *Scand J Immunol*, 2013, 77(6): 482-487.

(收稿日期: 2024-04-06; 修回日期: 2024-08-21; 编辑: 王小菊)